虎杖苷对去卵巢骨质疏松大鼠 β-Catenin 及 GSK-3β 蛋白表达的影响

徐敏敏，刘绍凡*，万锐杰，陈愉(重庆市中医院骨科，重庆 400021)

摘要：目的 研究虎杖苷对卵巢摘除骨质疏松大鼠 β-Catenin 及 GSK-3β 蛋白表达的影响，探索其对卵巢摘除骨质疏松大鼠的保护作用及可能的作用机制。**方法** SPF 级♀大鼠 60 只，随机分为假手术组、模型组、虎杖苷低(5 mg·kg^{-1}·d^{-1})、中(15 mg·kg^{-1}·d^{-1})、高剂量组(45 mg·kg^{-1}·d^{-1})，每组 12 只，灌胃给药。除假手术组外，其余各组采用摘除大鼠双侧卵巢的方法模拟骨质疏松模型。12 周后，用双能 X 线吸收法测量骨密度(bone mineral density，BMD)，ELISA 法检测 E2、ALP、TRAP 等生化指标的水平; Western blotting 法检测 β-Catenin 和 GSK-3β 蛋白的表达，qRTPCR 法检测 β-Catenin 和 GSK-3β mRNA 的表达。**结果** 与模型组比较，虎杖苷各组 BMD，E2 显著升高(P<0.01)、血清 ALP、TRAP 显著降低(P<0.01); β-Catenin 蛋白的表达升高(P<0.01)，GSK-3β 表达降低(P<0.01); β-Catenin mRNA 表达显著升高(P<0.01)，GSK-3β mRNA 表达显著降低(P<0.01)。**结论** 虎杖苷对去卵巢骨质疏松有一定的治疗作用，其机制可能与增加 β-Catenin 表达，减少 GSK-3β表达有关。

关键词：虎杖苷；骨质疏松；β-Catenin；GSK-3β；Wnt/β-Catenin

中图分类号：R285.5 **文献标志码：**A **文章编号：**1007-7693(2018)01-103-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2018.01.023

引用本文：徐敏敏, 刘绍凡, 万锐杰, 等. 虎杖苷对去卵巢骨质疏松大鼠 β -Catenin 及 GSK-3 β 蛋白表达的影响[J]. 中国现代应用药学, 2018, 35(1): 103-106.

Effect of Polydatin on the Expression of Wnt/β-Catenin Signal Pathway in Ovariectomized Osteoporosis Rats

XU Minmin, LIU Shaofan*, WAN Ruijie, CHEN Yu(*Department of Orthopedics, Chongqing Hospital of Traditional Chinese Medicine, Chongqing 400021, China*)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the effect of polydatin(PD) on the expression of β-Catenin and GSK-3β protein in ovariectomy osteoporosis rats. **METHODS** The 60 female SPF rats were randomly divided into sham operation group, model group, PD low(5 mg·kg^{-1}·d^{-1}), middle(15 mg·kg^{-1}·d^{-1}) and high dose(45 mg·kg^{-1}·d^{-1}) groups (12 rats in each group, ig), every group were established by ovariectomy except sham group. After 12 weeks, the bone mineral density (BMD) of these rats was detected by dual energy X-ray absorptionmetry, ELISA method was used to detect serum estradiol(E2), bone alkaline phosphatase(ALP), tartrate resistant acid phosphatase(TRAP) and other biochemical indicators of the level; Western blotting was used to detect the expression of β-Catenin and GSK-3β protein; qRTPCR was used to detect the expression of β-Catenin and GSK-3β mRNA. **RESULTS** Compared with model group, PD groups increased BMD, E2 significantly(P<0.01), decreased ALP, TRAP level(P<0.01) and increased the expression of β-Catenin protein and mRNA(P<0.01); decreased the expression of GSK-3β protein and mRNA (P<0.01). **CONCLUSION** PD has therapy effects in ovariectomy osteoporosis rats. Its mechanism could be relative with increasing the expression of β-Catenin protein and decreasing expression of GSK-3β.

KEY WORDS: polydatin; osteoporosis; β-Catenin; GSK-3β; Wnt/β-Catenin

骨质疏松症(osteoporosis，OP)是一种以骨量减少、脆性增加和微观结构退化为特征的一类全身性、慢性代谢性疾病。研究表明成骨细胞和破骨细胞表面有大量的雌激素受体，通过与雌激素相结合而发挥调节成骨和骨破坏的作用[1]。绝经后的女性 OP 的发病率明显增高，这与绝经后女性体内雌激素水平显著下降密切相关[2]。因此寻找能够有效代替雌激素的治疗方法迫在眉睫。近年来，天然雌激素——植物雌激素(phytoestrogens，PE)引起了国内外学者的广泛关注。虎杖苷(polydatm，PD)是蓼科植物虎杖的主要有效成分，研究发现 PD 具有雌激素样的抗氧化、调节血脂、抗肿瘤和抗血小板聚集等多种药理活性[3]。因此本实验通过研究 PD 对骨质疏松症模型大鼠的影响来探索 PD 防治骨质疏松症的具体作用机制，为临床治疗提供可靠的理论根据及实验基础。

基金项目：重庆市科委基础与前沿一般项目(CSTC2016jcyjA0373，CSTC2016jcyjA0268)

作者简介：徐敏敏，女，博士，主治医师 Tel: (023)63515534 E-mail: 1307198425@qq.com *通信作者：刘绍凡，男，博士，副主任医师 Tel: (023)63515534 E-mail: 1307098422@qq.com

1 材料和方法

1.1 动物

SPF 级 Sprague-Dawley(SD)大鼠 60 只，♀，体质量(250±20)g，由重庆医科大学实验动物中心提供，实验动物生产许可证编号：SCXK(渝)2012-0001。

1.2 试剂和仪器

PD(保赛生物有限公司，批号：20160307，纯度 98%)；17β-雌二醇(Sigma 公司，批号：E8875)；血清雌激素试剂盒(批号：20151215)、抗酒石酸酸性磷酸酶试剂盒(批号：20151021)、骨碱性磷酸酶试剂盒(批号：20151227)均购自碧云天；β-Cateninh 和 GSK-3β 一抗(兔源，Sigma 公司)；Trizol 提取液(上海生工)；DEPC 水(碧云天)；逆转录试剂盒(TAKARA)；定量试剂盒(TAKARA)；PCR 引物(上海生工)；micro17/17R 低温冷冻离心机(美国 Thermo)；全自动生化分析仪(日本 Toshiba 公司)；双能 X 线骨密度测量仪(美国 GE 公司)。

2 方法

2.1 模型的建立及验证

健康清洁级 SD 大鼠 60 只，♀，体质量(250±20)g，所有实验动物适应性喂养 1 周后随机分为假手术组、模型组、PD 低、中、高剂量组，采用经典的双侧卵巢切除术制备 OP 模型，假手术组仅切除卵巢周围少量脂肪组织。术后注射 10 万单位青霉素，以预防感染。

造模 12 周后，取假手术组和模型组的大鼠，腹腔注射水合氯醛麻醉，采用双能 X 线吸收法(Dual-energy X-ray absorptiometry，DXA)分别测量大鼠第 4、第 5 腰椎，左、右股骨的骨密度(bone mineral density，BMD)，比较 2 组数据，用 SPSS 进行 *t* 检验数据分析，来确定 OP 模型复制成功。

2.2 药物干预

验证造模成功后，将 PD 低、中、高剂量治疗组分别给予 PD[二甲基亚砜(dimethylsulfoxide，DMSO)溶解，双蒸水配置，其中 DMSO 在溶液中的浓度为 0.5%]5，15，45 $mg \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$ 灌胃。假手术组和模型组以等量的 DMSO 灌胃。灌胃期间，每周称量一次体质量，按照体质量调整给药剂量，连续 12 周。

2.3 取材方法

实验大鼠在第 12 周灌胃后，禁食 24 h 后取材。实验大鼠用 4%水合氯醛腹腔注射麻醉后取材。无菌条件下，取右后肢股骨干骺端，剥离附着的肌肉及结缔组织，充分暴露股骨头，用消毒后的老虎钳将股骨头钳碎，将股骨头放入高压灭菌的 EP 管内，做好标记，放入-80 ℃冰箱保存备用。

2.4 检测指标

2.4.1 BMD 检测　药物干预治疗 12 周后，将各组大鼠用 4%水合氯醛腹腔注射麻醉，四肢展开平置于双能 X 线吸收测量仪平台上，采用 DXA 测量实验大鼠 4，5 腰椎、左股骨、右股骨以及全身 BMD，再计算各 BMD 的均值，进行比较分析。

2.4.2 血清检测　用 4%水合氯醛(10 $mL \cdot kg^{-1}$)腹腔注射麻醉，心脏取血置于非抗凝试管中，血标本于 4 ℃静置 4 h 后，低温离心，取上层血清-20 ℃保存待测。严格按照 ELISA 试剂盒说明书操作，检测血清雌激素(E2)、骨碱性磷酸酶水平(ALP)、抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP)的水平。

2.4.3 β-Catenin 和 GSK-3β 蛋白表达的检测　向匀浆好的股骨组织中加入细胞裂解液，抽提蛋白，经 BCA 法测定蛋白浓度。向蛋白中加入生理盐水，将浓度调节为 2 000 $\mu g \cdot mL^{-1}$，再加入 4×上样缓冲液，沸水水浴，5 min，于–40 ℃条件存储；取 10 μL 样品进行 SDS-PAGE 凝胶(10%)电泳，恒压 80 V，时间为 30 min，再切换到 120 V，取下凝胶，200 mA 下转膜 1 h，用封闭液封闭 PVDF 膜，封闭过夜。剪膜后分别加入 1∶250 的 β-Catenin、GSK-3β 一抗，室温孵育 1 h，经 TBST 漂洗 3 次，加入 1∶5 000 的二抗，孵育 45 min，再经 TBST 漂洗 3 次；显色，曝光，显影，定影。

2.4.4 β-Catenin 和 GSK-3β mRNA 表达的检测　cDNA 合成及 PCR 反应股骨组织剪碎直接放入研钵中，加入少量液氮，迅速研磨，在冰上研磨直至研磨成粉末，加入相应体积 Trizol 进行 RNA 提取，采用 TAKARA One Step SYBR® PrimeScript™ RT-PCR Kit II 试剂，一步法实现反转录及定量 PCR，按说明书进行加样，加入 SYBR Green、目的基因上下游引物、稀释 10 倍后的 cDNA、ddH_2O。加样后放入定量 PCR 仪进行反应扩增。每个样本重复 3 次。PCR 反应程序为：95 ℃预变性 10 min，95 ℃变性 30 s，60 ℃ 30 s，72 ℃延伸 1 min，共 40 个循环。所有目的基因的阈值是与内参相比较，计算基因相对表达量。引物序列见表 1。

表 1 荧光定量 PCR 基因的序列

Tab. 1 Sequence of Fluorescent Quantitative PCR Gene

基因名称		引物序列
β-Catenin	上游	5'-GGAAAGCAAGCTCATCATTCT-3'
	下游	5'-AGTGCCTGCATCCCACCA-3'
GSK-3β	上游	5'-TAGGAACACCAACAAGGGAGC-3'
	下游	5'-CGAGCGTGAGGAGCGATAAG-3'
β-actin	上游	5'-CACCCGCGAGTACAACCTTC-3'
	下游	5'- CCCATACCCACCATCACACC-3'

2.5 统计学方法

采用 SPSS 18.0 统计软件进行统计学处理，定量指标运用方差处理，数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 BMD 检测

3.1.1 模型检测 造模 12 周后检测假手术组和模型组的 BMD，其结果显示，与假手术组比较，模型组中 4，5 腰椎、右股骨和左股骨的 BMD 均显著降低($P<0.05$)，表明去除卵巢术能较为稳定的复制 OP 模型。结果见表 2。

表 2 假手术组和模型组不同部位 BMD 均值的比较(n=12, $\bar{x}\pm s$)

Tab. 2 Comparison of BMD in different parts of sham group and model group(n=12, $\bar{x}\pm s$) $g\cdot cm^{-2}$

组 别	4、5 腰椎	右股骨	左股骨
假手术组	0.292±0.032	0.341±0.040	0.309±0.039
模型组	0.212±0.019[1)]	0.213±0.009[1)]	0.229±0.008[1)]

注：与假手术组比较，[1)]$P<0.05$。

Note: Compared with group Sham, [1)]$P<0.05$.

3.1.2 干预后 BMD 的检测 药物干预 12 周后，用 DXA 测定各组大鼠 BMD。结果假手术组、模型组、PD 5，15，45 $mg\cdot kg^{-1}\cdot d^{-1}$ 组平均 BMD 分别为 (0.311±0.008)，(0.218±0.007)，(0.252±0.004)，(0.265±0.007)，(0.268±0.006)$g\cdot cm^{-2}$。结果表明，与假手术组比较，模型组中各部位的 BMD 均有显著的下降($P<0.05$)；与模型组比较，PD 各组 BMD 均显著升高($P<0.01$)。

3.2 血清学检查

与假手术组比较，模型组的去卵巢大鼠的血清 E2 水平明显降低($P<0.01$)，血清 ALP、TRAP 水平显著增加($P<0.01$)；与模型组比较，PD 组大鼠的血清 E2 水平明显升高($P<0.01$)，血清 ALP、TRAP 降低($P<0.01$)，并且 PD 15，45 $mg\cdot kg^{-1}\cdot d^{-1}$ 组 E2 水平略高于假手术组，表明 PD 能明显改善去卵巢的低雌激素状态，增强 OP 患者的成骨能力，促进骨形成。结果见表 3。

表 3 PD 对血清 E2、ALP、TRAP 含量的影响(n=12, $\bar{x}\pm s$)

Tab. 3 Effect of polydatin on serum levels of E2, ALP and TRAP(n=12, $\bar{x}\pm s$)

组 别	E2/$pmol\cdot L^{-1}$	ALP/$\mu mol\cdot L^{-1}$	TRAP/$ng\cdot L^{-1}$
假手术组	240.783±12.183	64.714±3.265	182.130±10.770
模型组	190.245±6.256[1)]	148.378±7.121[1)]	509.212±12.303[1)]
PD 5 $mg\cdot kg^{-1}\cdot d^{-1}$ 组	186.268±5.562	114.613±2.809[2)]	366.946±54.394[2)]
PD 15 $mg\cdot kg^{-1}\cdot d^{-1}$ 组	247.942±11.372[2)]	79.064±2.864[2)]	219.480±12.415[2)]
PD 45 $mg\cdot kg^{-1}\cdot d^{-1}$ 组	249.157±12.015[2)]	86.612±5.370[2)]	233.195±10.949[2)]

注：与假手术组比较，[1)]$P<0.01$；与模型组比较，[2)]$P<0.01$。

Note: Compared with sham group, [1)]$P<0.01$; compared with model group, [2)]$P<0.01$.

3.3 药物干预后各组 β-Catenin 和 GSK-3β 蛋白表达的情况

与假手术组比较，模型组 β-Catenin 蛋白表达明显降低，GSK-3β 表达显著增加($P<0.01$)；与模型组比较，PD 各剂量组 β-Catenin 蛋白表达显著提高($P<0.01$)，GSK-3β 蛋白表达显著降低($P<0.01$)。见表 4 和图 1。

表 4 各组大鼠 β-Catenin 和 GSK-3β 蛋白表达的情况(n=12, $\bar{x}\pm s$)

Tab. 4 Expression of β-Catenin and GSK-3β proteins in rats of each group(n=12, $\bar{x}\pm s$)

组 别	β-Catenin	GSK-3β
假手术组	0.778±0.012	0.124±0.006
模型组	0.201±0.004[1)]	0.686±0.015[1)]
PD 5 $mg\cdot kg^{-1}\cdot d^{-1}$ 组	0.528±0.007[2)]	0.422±0.005[2)]
PD 15 $mg\cdot kg^{-1}\cdot d^{-1}$ 组	0.577±0.011[2)]	0.339±0.004[2)]
PD 45 $mg\cdot kg^{-1}\cdot d^{-1}$ 组	0.643±0.014[2)]	0.285±0.006[2)]

注：与假手术组比较，[1)]$P<0.01$；与模型组比较，[2)]$P<0.01$。

Note: Compared with sham group, [1)]$P<0.01$; compared with model group, [2)]$P<0.01$.

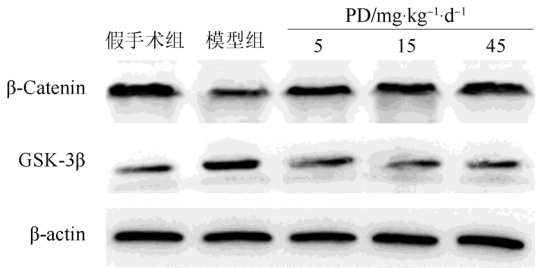

图 1 各组大鼠 β-Catenin 和 GSK-3β 蛋白表达的 Western blotting 图

Fig. 1 Western blotting diagrams of the expression of β-Catenin and GSK-3 β proteins in each group of rats

3.4 药物干预后各组 β-Catenin 和 GSK-3β mRNA 表达的情况

与假手术组比较，模型组的 β-Catenin mRNA 表达明显降低，GSK-3β mRNA 表达显著增加(P<0.01)；与模型组比较，PD 各剂量组的 β-Catenin mRNA 表达显著提高(P<0.01)，GSK-3β mRNA 表达显著降低(P<0.01)。见表 5 图 2。

表 5 各组大鼠 β-Catenin 和 GSK-3β mRNA 表达的情况($\bar{x}\pm s$，n=12)

Tab. 5 Expression of β-Catenin and GSK-3β mRNA in rats of each group($\bar{x}\pm s$, n=12)

组 别	β-Catenin mRNA	GSK-3β mRNA
假手术组	1.085±0.108	1.018±0.108
模型组	0.236±0.036[1)]	7.322±1.500[1)]
PD 5 mg·kg^{-1}·d^{-1} 组	0.446±0.020[2)]	4.349±0.826[2)]
PD 15 mg·kg^{-1}·d^{-1} 组	0.505±0.024[2)]	4.018±0.808[2)]
PD 45 mg·kg^{-1}·d^{-1} 组	0.572±0.030[2)]	3.325±0.724[2)]

注：与假手术组比较，[1)]P<0.01；与模型组比较，[2)]P<0.01。

Note: Compared with sham group, [1)]P<0.01; compared with model group, [2)]P<0.01.

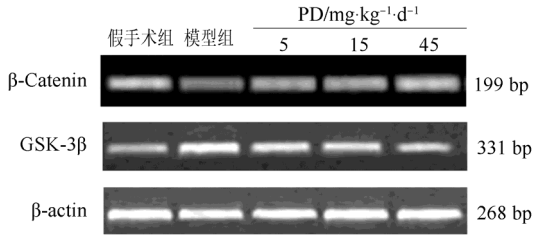

图 2 大鼠 β-Catenin 和 GSK-3β mRNA 表达的 qRTPCR 图

Fig. 2 qRTPCR images of the expressions of β-Catenin and GSK-3β mRNA in each group of rats

4 讨论

已有研究表明 OP 的防治受一系列的细胞因子、信号分子和周围环境因素的影响，它们共同通过调节信号传导通路促进骨形成，抑制骨吸收。信号传导通路在骨质疏松的诊疗扮演着重要角色，其中经典的 Wnt/β-Catenin 信号通路在骨形成和骨代谢过程中的作用尤为重要[4]。研究表明，标准 Wnt/β-Catenin 信号通路激活后，能够抑制 β-Catenin 降解，使其稳定并积聚于细胞质中，进而移位到细胞核，通过转录调控作用促进成骨细胞分化，并抑制破骨细胞分化，从而促进骨形成[5]。对骨组织中调控 Wnt 信号通路活性机制的研究发现，由骨细胞分泌的骨硬化蛋白能够抑制 Wnt 信号通路激活[6]。

β-Catenin 是整个 Wnt 信号通路中最重要的影响分子，其在细胞质内磷酸化和降解是由关键酶 GSK-3β 所影响[7]。有实验表明 GSK-3β 小分子抑制剂能够增加骨量，改善骨机械性能并减少骨折发生率，体内抑制 GSK-3β 能够使 Wnt 信号通路增强，并促使成骨细胞分化，骨合成代谢加强。而在正常和去卵巢的大鼠中，GSK-3β 的抑制能够增强体内的骨容积[8]。

实验结果表明，切除大鼠双侧卵巢后 BMD、血清 E2 显著降低，血清 ALP、TRAP 显著升高，β-Catenin 蛋白的表达明显下降，而 GSK-3β 蛋白的表达大量增加。PD 治疗后，能够提高 BMD、血清 E2，降低血清 ALP， TRAP，升高 β-Catenin 蛋白和 mRNA 表达，降低 GSK-3β 蛋白和 mRNA 的表达。但 PD 的剂量依赖性并不是特别明显，3 个剂量组作用效果相近，探讨其原因可能与 PD 作用靶点饱和有关。综上所述，PD 对卵巢摘除骨质疏松大鼠的作用机制可能为：通过下调 GSK-3β 蛋白和 mRNA 的表达，从而促进胞内 β-Catenin 稳定，聚并且转入到胞核中，激活 Wnt/β-Catenin 信号通路，从而达到调控成骨的效果。

REFERENCES

[1] ŽOFKOVÁ I, ZAJÍČKOVÁ K, HILL M. The estrogen receptor alpha gene determines serum androstenedione levels in postmenopausal women [J]. Steroids, 2002, 67(10): 815-819.

[2] DAS D K, MUKHERJEE S, RAY D. Erratum to: resveratrol and redwine, healthy heart and longevity [J]. Heart Fail Rev, 2011, 16(4): 68-78

[3] 张彩宁. 中药虎杖雌激素活性成分及其物质基础研究[D]. 大连：中国科学院大连化学物理研究所, 2006.

[4] MONROE D G, MCGEE-LAWRENCE M E, OURSLER M J, et al. Update on Wnt signaling in bone cell biology and bone disease [J]. Gene, 2012, 492(10): 1-18.

[5] TARANTA A, BRAMA M, TETI A, et at. The selective estrogen receptor modulator raloxifene regulates osteoclast and ost eoblastactivity *in vitro* [J]. Bone , 2002, 30(2): 368-376.

[6] KOMORI T. Signaling networks in RUNX2-dependent bone development [J]. J Cell Biochem, 2011, 112: 750-755.

[7] LI J P, LI W J, ZENG Y, et al. Zhuanggu Zhitong capsule protect against postmenopausal osteoporosis induced by ovariectomy via estrogen recepor-related receptor in rats [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2016, 33(3): 690-694.

[8] SEMNOV M, TAMAI K, HE X. SOST is a ligand for LRP5/LRP6 and a Wnt signaling inhibitor [J]. J Biol Chem, 2005, 280(29): 26770-26775.

收稿日期：2017-05-23

(本文责编：曹粤锋)